

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Juli 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/057446 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/10

[CH/CH]; Zürcherstrasse 178, CH-8645 Jona (CH). **FRE-ITAG**, Ruth [DE/CH]; Chemin de Bochet 32, CH-1015 St-Sulpice (CH). **HILBRIG**, Frank [DE/CH]; Chemin du Bochet 32, CH-1025 St. Sulpice (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH01/00741

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. Dezember 2001 (24.12.2001)

(74) **Anwalt: HERRMANN, Peter**; Meiersmattstrasse 30, CH-6043 Adligenswil (CH).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AU, CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:

80/01 19. Januar 2001 (19.01.2001) CH

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)**: **DRM, DR. MÜLLER AG** [CH/CH]; Alte Landstrasse 415, Postfach, CH-8708 Männedorf/ZH (CH). **POLYTAG TECHNOLOGY SA** [CH/CH]; Parc Scientifique EPFL, PSE-A, CH-1015 Lausanne (CH).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US)**: **SCHUMACHER, Ivo**

(54) **Title**: METHOD FOR TREATING BIOMASS FOR PRODUCING CELL LYSATE CONTAINING PLASMID DNA

(54) **Bezeichnung**: VERFAHREN ZUR AUFBEREITUNG VON BIOMASSE ZUR HERSTELLUNG VON PLASMID DNA HALTIGEM ZELLYSAT

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for the integrated treatment of biomass from a cell culture process for producing clear cell lysate containing plasmid DNA. According to the invention, in a first step filtering occurs in a filter in the presence of a filtering agent. In a second step, the biomass contained in the filter cake which is obtained is thermally decomposed and the cell lysate is filtered in another step. The obtained cell lysate containing plasmid DNA is characterised by a clarity of OD₆₀₀ of at a maximum of 0.05E/cm and which is suitable for cloning, transformation, transfection, microinjection in cells, gene therapy, DNA vaccination and/or for polymerase chain reaction (PCR).

(57) **Zusammenfassung**: In einem Verfahren zur integrierten Aufbereitung von Biomasse aus einem Zellkulturprozess zur Herstellung von klarem, Plasmid DNA haltigem Zelllysat wird jeweils in Gegenwart eines Filterhilfsmittels in einer ersten Stufe in einem Filter filtriert, in einer zweiten Stufe die im erhaltenen Filterkuchen enthaltene Biomasse thermisch aufgeschlüsselt und in einer weiteren Stufe das Zelllysat filtriert. Das erhaltene Plasmid DNA haltige Zelllysat zeichnet sich durch eine Klarheit OD₆₀₀ von höchstens 0.05E/cm aus und ist zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Gentherapie, zur DNA Vakzinierung und/oder zur Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) geeignet.

WO 02/057446 A2

5

10 Verfahren zur Aufbereitung von Biomasse zur Herstellung von Plasmid DNA
haltigem Zelllysate.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur integrierten Aufbereitung von
Biomasse aus einem Zellkulturprozess zur Herstellung von klarem, Plasmid DNA
haltigem Zelllysate, sowie ein Plasmid DNA Zelllysate, hergestellt nach dem
Verfahren.

20

Unter Aufbereitung ist ein Konditionierungsverfahren zur Bereitstellung von
klarem, Plasmid DNA haltigem Zelllysate zu verstehen. Unter einem integrierten
Verfahren soll ein Verfahren verstanden werden, in welchem die einzelnen
Verfahrensschritte ineinander übergehen, so dass der Produktstrom praktisch
25 kontinuierlich geführt wird. Das an sich mehrstufige Verfahren kann kontinuierlich
oder chargenweise durchgeführt werden.

30

Die Abtrennung von biologischem Material aus einem Zellkulturprozess, der
Aufschluss des biologischen Materials und die Herstellung eines klaren, Plasmid
DNA haltigen Zelllysats ist im Bereich der Molekularbiologie eine gebräuchliche
Methode. Bei den bekannten Verfahren wird biologisches Material, beispielsweise
aus E.coli Bakterienzellen, vom Kulturüberstand abgetrennt und nach
Wiederaufschlammung aufgeschlossen. Nach Abtrennung der festen Bestandteile
wird ein sogenanntes klares Zelllysate bereitgestellt, das neben genomischer DNA,
35 RNA, Proteinen und Endotoxinen die Plasmid DNA enthält.

5 Es ist bekannt, biologisches Material durch chargenweises oder kontinuierliches Zentrifugieren aus dem Zellkulturprozess abzutrennen. Die Abtrennung von Backhefezellen durch Filtration über ein Bett von Filterhilfsmittel wird in GB-A-1082862 beschrieben. Danach ist auch die Abtrennung von Zellrückständen mittels Filterhilfsmittel aus einem Hefeautolysat bekannt.

10

Die üblichen Methoden zum Zellaufschluss sind die bekannte alkalische Lyse und die thermische Lyse. Um den Zellaufschluss zu verbessern werden häufig Enzyme, beispielsweise Lysozym, und/oder Detergenzien zur Zellsuspension zugegeben. Bei dem alkalischen Lyseverfahren wird nach dem Zellaufschluss bei
15 pH 12 durch Zugabe von Natronlauge und Natriumdodecylsulfat und anschliessendem Neutralisieren mit einem hochmolaren Acetatpuffer ein Präzipitat erhalten, das im wesentlichen die Zelldebris und Teile der genomischen DNA und der Proteine enthält. Die vollständige Abtrennung dieses Präzipitats ist nur durch intensives Zentrifugieren zu erreichen. Eine Zentrifugalbeschleunigung von 12'000
20 g reicht dazu nicht aus (I. Feliciello et al., Anal. Biochem. 212 (1993) 394-401). Erst bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 26'000 g für 30 Minuten bei 4°C kann das Präzipitat weitestgehend abgetrennt werden. Die Filtration dieses Präzipitats ist dagegen auch unter Zuhilfenahme feinsten Filterhilfsmittel oder in Kombination mit einem Flottierungsschritt mit niedrigen Prozessraten und hohen Verlusten von
25 Plasmid DNA verbunden. Die Adsorption von Plasmid DNA an der Filterhilfsmitteloberfläche trägt beträchtlich zu den Verlusten bei. Insbesondere Plasmid DNA bindet sehr schnell und fest an solchen Mineraloberflächen, wenn die Konzentration zweiwertiger Kationen 0.1 mmol oder die einwertiger Kationen 20 mmol im Falle von Kalium oder 50 mmol im Falle von Natrium übersteigt (G. Romanowski et al., Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991) 1057-1061).
30

Hochmolekulare Nukleinsäuren sind empfindlich gegenüber Scherkräften. Starke Scherkräfte können zu irreversiblen Schädigungen von Nukleinsäuren, insbesondere zu Strangbrüchen führen. Aus diesem Grund werden mechanische
35 Aufschlussverfahren für die Nukleinsäure-Aufbereitung selten eingesetzt (A. Carlson et al., Biotechnol. Bioeng. 48 (1995) 303-315). Es ist auch bekannt, dass bei industriellen Zentrifugen mit kontinuierlichem Flüssigkeitseintrag hohe

- 5 Scherkräfte am Rotoreingang auf die Nukleinsäuren wirken, die unweigerlich zu Strangbrüchen führen.

10 In der WO 96/36706 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem Mikroorganismen in Gegenwart von Detergenzien (Triton[®]) und durch Erhitzen auf 70°C bis 100°C in einem Durchflusswärmetauscher aufgeschlossen werden. Es handelt sich um ein Kombinationsverfahren aus Thermolyse und mit einem Detergenz (optional mit Lysozym). Ohne Lysozym wird eine Temperaturbehandlung während 30 Sekunden beschrieben; mit Lysozym eine solche von 6 Sekunden. Beim Zellaufschluss durch Erhitzen bilden sich feste Verbindungen aus Debris, 15 genomischer DNA und Proteinen. Zudem darf durch die Hitzebehandlung eine weitestgehende Denaturierung von DNA abbauenden Enzymen, sogenannten DNasen, angenommen werden. Ein klares Zelllysate wird nach chargenweisem Zentrifugieren erhalten. In diesem Verfahren wird nur der Zellaufschluss kontinuierlich durchgeführt, die Abtrennung der festen Bestandteile erfolgt 20 chargenweise durch Zentrifugieren. Um das endgültige klare Zelllysate zu erhalten, musste im Anschluss an die Zentrifugation noch eine Filtration über einen Membranfilter durchgeführt werden.

25 Nach WO 92/207863 sind eine Vorrichtung und ein Verfahren zu Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellsuspensionen bekannt. Danach werden die Zellen in den Hohlräumen einer vorgelegten, porösen Matrix in Form einer Schicht immobilisiert. Dies wird durch Tiefenfiltration in der Matrix erreicht, indem die Hohlraumgröße in der Größenordnung der Zellen liegt und die Matrixoberfläche Ionenaustauschereigenschaften aufweist. Die Partikelgröße der Matrix beträgt 10 30 bis 50 µm. Aufgrund der Ionenaustauschereigenschaften adsorbiert DNA an der Matrixoberfläche. Eine Adsorption von DNA ist nicht Gegenstand der Erfindung. Das bekannte Verfahren liefert ein aufgereinigtes DNA, nicht jedoch ein klares, Plasmid DNA haltiges Zelllysate.

35 Nach der EP-A-0814156 wird ein Verfahren zur Aufreinigung von DNA beschrieben. Die darin verwendeten Kieselguren sind nicht näher spezifiziert. Die

5 Lyse erfolgt nach dem alkalischen Verfahren. Eine thermische Lyse wird nicht beschrieben.

Aus dem Stand der Technik sind somit weder Verfahren bekannt, die es ermöglichen, grosse Mengen Biomasse integriert aufzuarbeiten, noch sind
10 Verfahren bekannt, mit denen integriert grosse Mengen Plasmid DNA haltige, klare Zelllysate bereitgestellt werden können.

Es besteht ein Bedarf nach einem effizienten Konditionierungsverfahren zur Bereitstellung von klarem, Plasmid DNA haltigem Zelllysat aus einem
15 Zellkulturprozess, das die Plasmid DNA Aufreinigung ermöglicht.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe ist es daher, ein integriertes Aufbereitungsverfahren bereitzustellen, das es auf effiziente und kontrollierte Weise unter Vermeidung der Nachteile des alkalischen
20 Lyseverfahrens und der Zentrifugation ermöglicht, grosse Mengen klarer Zelllysate mit hoher Plasmid DNA Ausbeute aus einer Biomasse bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss dadurch gelöst, dass jeweils in Gegenwart eines Filterhilfsmittels in einer ersten Stufe in einem Filter filtriert, in einer zweiten
25 Stufe die im Filterkuchen enthaltene Biomasse thermisch aufgeschlossen und in einer weiteren Stufe das Zelllysat filtriert wird.

Es wurde nun festgestellt, dass nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung schnell jede Volumenmenge, von 50 ml bis 10'000 l, Biomasse zu klarem
30 Zelllysat, das die Plasmid DNA enthält, verarbeitet werden kann. Besonders vorteilhaft ist, dass mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung über den angelegten Überdruck beim Filtrieren eine Kontrolle über die auf die Nukleinsäuren wirkenden Scherkräfte gegeben ist. Insbesondere zeigt ein erfindungsgemäss hergestelltes Zelllysat nach gelelektrophoretischer Auftrennung
35 neben den Banden für genomische DNA und RNA deutlich die Banden für Plasmid DNA, ohne erkennbare Schädigung der Nukleinsäuren infolge

- 5 Strangbrüchen. Ausserdem ist das erhaltene Zelllysate durch die Hitzebehandlung von unangenehmen Gerüchen befreit.

Es ist zweckmässig, dass das Filterhilfsmittel während des Aufschlusses vorhanden ist. Das hat den Vorteil, dass das für die folgende Klarfiltration des Zelllysates benötigte Filterhilfsmittel bereits vorhanden ist. Die kontinuierliche Nutzung desselben Filterhilfsmittels über alle Teilschritte (Abtrennung, Aufschluss, Klärung) ist zudem verfahrenstechnisch effizient und damit wirtschaftlich. Besonders vorteilhaft ist, wenn anstatt den Filterkuchen für die Lyse aufzuschlämmen, unmittelbar im existierenden Filterkuchen kombiniert thermisch aufgeschlossen und klarfiltriert wird (zum Beispiel durch Durchpumpen von heissem Lysepuffer) und somit direkt sehr klares Zelllysate gewonnen werden kann. Damit wird das Gesamtverfahren durch die Reduktion der Zahl der Einzelverfahrensschritte noch effizienter und damit ökonomisch noch günstiger.

- 20 Die Auswahl des Filterhilfsmittels ist von entscheidender Bedeutung. Das Filterhilfsmittel muss inert sein, um Adsorptionseffekte zu minimieren. Es hat sich als zweckmässig erwiesen, als Filterhilfsmittel kalzinierte Kieselguren mit einem SiO_2 -Gehalt von wenigstens 90 Gew.-% und zusätzlich folgenden Eigenschaften zu verwenden:

- 25 • Nassdichte: $0.2 - 0.4 \text{ g/cm}^3$
- Permeabilität: $0.02 - 2 \text{ Darcy}$
- BET Oberfläche: $2 - 20 \text{ m}^2/\text{g}$
- Geometrische Oberfläche: $0.25 - 0.65 \text{ m}^2/\text{g}$
- Partikelgrösse $2.5 - 8.0 \text{ }\mu\text{m}$
- 30 • Partikelgrössenretention (99%): $0.1 - 2 \text{ }\mu\text{m}$

- Das hat den Vorteil, dass in einem Filtrationsschritt sehr klares Filtrat mit ausreichend hohem Filtrationsfluss bei moderatem Differentialdruck erhalten wird. Neben dieser Kombination aus Effizienz und Effektivität bietet die Verwendung hochreiner Filterhilfsmittel den Vorteil, dass deren Oberflächen standardisiert sind, und damit deren Eigenschaften kontrolliert werden können.

5 Es ist gleichfalls zweckmässig, dass in allen Stufen dasselbe Filterhilfsmittel verwendet wird. Das hat den Vorteil, dass die einzelnen Verfahrensschritte ineinander übergehen, so dass der Produktstrom praktisch kontinuierlich geführt wird.

10 Die Menge an Filterhilfsmittel, bezogen auf den Feststoffgehalt der zu filtrierenden Lösung, die Filtrationsfläche und die Höhe des maximal anzulegenden Filtrationsüberdrucks kann nur empirisch bestimmt werden.

Es hat sich als besonders zweckmässig erwiesen, den Aufschluss thermisch durchzuführen. Das hat den Vorteil, dass der Aufschluss schonend, beispielsweise im physiologischen pH-Bereich, unter sehr gut steuerbaren und reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden kann. Die Prozessrate kann erheblich gesteigert werden, wenn anstelle der chargenweisen Erhitzung der Zellsuspension ein Durchflusswärmetauscher verwendet wird. Es ist ausserdem anzunehmen, dass beim Erhitzen ein Teil der DNA-abbauenden Enzyme inaktiviert wird. Im Vergleich zur alkalischen Lyse ist die Geruchsbelästigung bei der thermischen Lyse deutlich geringer.

Der Aufschluss wird bei Temperaturen zwischen 70°C und 90°C, bevorzugt bei 70°C bis 85°C, insbesondere bei 80°C durchgeführt. Bei einer Temperatur von weniger als 70°C ist der thermische Aufschluss unvollständig; bei einer Temperatur über 90°C schmilzt Plasmid DNA. Die Dauer der thermischen Behandlung kann nur empirisch bestimmt werden. Sie beträgt 30 Sekunden bis einige Minuten.

Der Aufschluss muss bei einem pH-Wert zwischen 7 und 10 durchgeführt werden. In diesem pH-Bereich sind die Adsorptionsverluste an Plasmid DNA minimal und die Aktivität von Lysozym optimal. Ausserdem liegt Plasmid DNA im gewonnenen klaren Zelllysate bereits im physiologischen pH-Bereich vor.

Es ist zweckmässig, den Aufschluss in Gegenwart von ausschliesslich einwertigen Kationen durchzuführen. Das hat den Vorteil, dass die Verluste bei der

5 abschliessenden Filtration zum klaren Plasmid DNA-Zelllysat infolge von Adsorption an der Filterhilfsmitteloberfläche minimal sind. Mehrwertige Kationen, die während des Zellaufschlusses freigesetzt werden, werden durch Komplexmierungsmittel maskiert.

10 Die maximale Konzentration an Kationen soll höchstens 20 mmol für K^+ , höchstens 50 mmol für Na^+ oder höchstens 150 mmol für NH_4^+ betragen. Bei Überschreiten dieser Maximalkonzentrationen treten Verluste von Plasmid DNA infolge von Adsorption an der Filterhilfsmitteloberfläche auf. Sind mehrere Kationenspezies vorhanden, ist bei der Festlegung der zulässigen
15 Gesamtkonzentration die Additivität der Effekte zu berücksichtigen.

Klares, Plasmid DNA haltiges Zelllysat zeichnet sich durch eine Klarheit OD_{600} von höchstens 0.05 E/cm, entsprechend einer Abnahme der Trübung von mindestens 99 %, aus. Das erhaltene klare Zelllysat mit der Plasmid DNA kann
20 zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Gentherapie, zur DNA Vakzinierung und /oder zur Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet werden.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher beschrieben werden.

25

Beispiel 1

Plasmid DNA pHEN1 (4618 bp) im E.coli Stamm TG1 wurde im 2TY Medium bei 37°C für 16 Stunden im Schüttelkolben vermehrt. Zu drei E.coli Suspensionen von
30 jeweils 125 ml ($OD_{600} = 6$) wurde CelpureP300[®] (Markenzeichen der Firma World Minerals Inc.) mit 15, 30 bzw. 60 g/l zugegeben und kontinuierlich bei 20°C gerührt. Anschliessend wurde jede Suspension in einen Nutschefilter (10 cm² Filterfläche, 200 ml Füllvolumen) gegeben, in dem zuvor ein Vorfilterkuchen von 2 kg/m² CelpureP300[®] über einem Filtermedium aus Polypropylen Monofilament
35 (Porengrösse 10 µm) aufgebaut worden war. Die Filtration wurde bei 0.5 bar Überdruck und 20°C durchgeführt.

- 5 Es wurde in allen Fällen ein klares Filtrat erhalten. Der höchste mittlere Filtrationsfluss ($2.8 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{h}$) wurde mit 30 g/l CelpureP300® erreicht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

CelpureP300® (*) in g/l	Mittlerer Filtrationsfluss ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{h}$)	OD ₆₀₀ des Filtrats (E/cm)	Abnahme der Trübung in %
60	1.8	0.04	99
30	2.8	0.05	99
15	2.4	0.03	99

- 10 (*) Eigenschaften: Siliziumdioxidanteil: 98.65%; Nassdichte: 0.26 g/cm^3 .
 Permeabilität: $0.15 - 0.30$ Darcy; BET Oberfläche: $4 - 6 \text{ m}^2/\text{g}$;
 Geometrische Oberfläche: $0.62 \text{ m}^2/\text{g}$; Partikelgrößenretention (99%): $0.6 - 0.75 \text{ }\mu\text{m}$.

- 15 Beispiel 2:

Lysepuffer A:

150 mmol Tris·HCl, 25 mmol Na₂EDTA, 8 Gew.-% Saccharose (pH 9)

Lysepuffer B:

- 20 wie Lysepuffer A, zusätzlich 2% TritonX-100® (Markenzeichen der Firma Röhm und Haas)

- 25 Zwei Filterkuchen aus dem Beispiel 1 mit 30 g/l CelpureP300® wurden jeweils in 190 ml Lysepuffer A bzw. B resuspendiert. 500 U/ml Lysozym wurde jeweils zugegeben, und die Suspensionen wurden auf 80°C für 30 Sekunden unter kontinuierlichem Rühren aufgeheizt. Die noch heißen Suspensionen wurden in einen Nutschefilter gegeben, in dem zuvor ein Vorfilterkuchen von 2 kg/m^2 CelpureP300® (inkubiert für 15 Minuten im entsprechenden Lysepuffer) über einem Filtermedium aus Polypropylen Monofilament (Porengröße $10 \text{ }\mu\text{m}$)
 30 aufgebaut worden war. Die Filtration wurde bei 0.5 bar Überdruck durchgeführt.

- 5 Mittels des Lysepuffers A wurde ein klares Zelllysats ($OD_{600} = 0.02$) mit einem mittleren Filtrationsfluss von $0.4 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{h}$ erhalten. Durch die Zugabe von Triton X-100[®] (Lysepuffer B) war demgegenüber der mittlere Filtrationsfluss um 50% reduziert. Eine signifikante Erhöhung des mittleren Filtrationsflusses auf $1.5 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{h}$ im Lysepuffer A wurde erreicht, als die Gesamtmenge CelpureP300[®] auf
10 100 g/l eingestellt worden war und als PVDF Kette/PTFE Schuss Monofilament (Porengröße $11.5 \text{ }\mu\text{m}$) als Filtermedium benutzt worden war.

Beispiel 3

- 15 3.7ml λ DNA (E.coli; 48.5 kb dsDNA; 0.51 mg/ml) wurden in 25 ml einer Pufferlösung bestehend aus 250 mmol Tris·HCl, 25 mmol Na_2EDTA , 8 Gew.-% Saccharose (pH 9.09) gegeben. 0.75 g CelpureP300[®] (30 g/l) wurden zugegeben, und die Suspension wurde für 30 Minuten bei 20°C und 200 rpm geschüttelt.
- 20 UV Absorptionsmessungen bei 260 nm und ein PicoGreen[®] Test (Kit der Firma Molekular Probes Inc.) ergaben keinen Unterschied zwischen der λ DNA Konzentration im Überstand der Suspension und der Konzentration in der Ausgangslösung.

25 Beispiel 4

- E.coli Zellen DH5 α mit der Plasmid DNA pEGFP-N1 wurden zu vier gleichen Teilen in einem Puffer bestehend aus TrisHCl und 10 mM EDTA suspendiert. Aus einer dieser Suspensionen wurden die Zellen mit dem Nucleobond[®] AX Kit
30 (Markenzeichen der Firma Macherey-Nagel) nach dem alkalischen Lyseverfahren aufgeschlossen, und die Plasmid DNA isoliert und aufgereinigt. Bei den anderen drei Suspensionen wurden die Zellen thermisch für 5 Minuten bei 70°C / pH 9, 70°C / pH 10 bzw. 60°C / pH 10 aufgeschlossen, und die Plasmid DNA wurde jeweils mit dem gleichen Kit isoliert und aufgereinigt. Die Plasmid DNA
35 Quantifizierung der vier Proben mittels des PicoGreen Tests ergab, dass der Aufschluss nach dem alkalischen Lyseverfahren und die thermische Lyse bei 70°C und pH 9 bzw. pH 10 zu gleichen Ausbeuten an Plasmid DNA führte, während der

- 5 thermische Aufschluss bei 60°C und pH 10 nur etwa 30% der Ausbeute der nach den drei anderen Verfahren erhaltenen Plasmid DNA lieferte. Aus Beispiel 3 ist bekannt, dass unter den beschriebenen thermischen Lysebedingungen keine Adsorption von Plasmid DNA an der Filterhilfsmitteloberfläche zu erwarten ist.

10

Messverfahren:**Klarheitsmessung**

- Die Klarheit eines Filtrats (optische Dichte, OD) wurde mit einem UV/Vis Spektrometer Lambda 20 der Firma Perkin-Elmer im Absorptionsmodus bei 15 600 nm und einer Weglänge von 1 cm gegen Wasser als Referenz bei Raumtemperatur bestimmt.

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur integrierten Aufbereitung von Biomasse aus einem Zellkulturprozess zur Herstellung von klarem, Plasmid DNA haltigem Zelllysatz, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils in Gegenwart eines Filterhilfsmittels in einer ersten Stufe in einem Filter filtriert, in einer zweiten Stufe die im Filterkuchen enthaltene Biomasse thermisch aufgeschlossen und in einer weiteren Stufe das Zelllysatz filtriert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Aufschluss bei 70°C bis 90°C durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der thermische Aufschluss während wenigstens 30 Sekunden durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Filterhilfsmittel Kieselguren mit folgenden Eigenschaften verwendet werden:
- Siliziumdioxidanteil: \geq 90 %
 - Nassdichte: 0.2 – 0.4 g/cm³
 - Permeabilität: 0.02 – 2 Darcy
 - BET Oberfläche: 2 – 20 m²/g
 - Geometrische Oberfläche: 0.25 – 0.65 m²/g
 - Partikelgrösse 2.5 – 8.0 µm
 - Partikelgrößenretention (99%): 0.1 - 2 µm
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass in allen drei Stufen dasselbe Filterhilfsmittel verwendet wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Aufschluss bei einem pH-Wert zwischen 7 und 10 durchgeführt wird.

- 5 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der
Aufschluss in Gegenwart von ausschliesslich einwertigen Kationen
durchgeführt wird.
- 10 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die
maximale Konzentration an Kationen höchstens 20 mmol für K^+ , höchstens
50 mmol für Na^+ oder höchstens 150 mmol für NH_4^+ ist.
- 15 9. Plasmid DNA haltiges Zelllysate, hergestellt nach dem Verfahren gemäss
den Ansprüchen 1 bis 8, gekennzeichnet durch eine Klarheit OD_{600} von
höchstens 0.05 E/cm, entsprechend einer Abnahme der Trübung um
mindestens 99%.